

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003175

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-050082
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

09. 3. 2005

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2004年 2月25日
Date of Application:

出願番号 特願2004-050082
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2004-050082

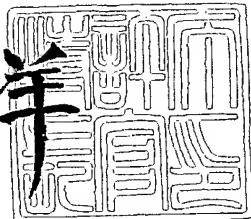
出願人 国立大学法人岐阜大学
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所
松下環境空調エンジニアリング株式会社

2005年 4月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 8009150035
【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願
【提出日】 平成16年 2月25日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
【住所又は居所】 岐阜県岐阜市柳戸1-1 岐阜大学農学部内
【氏名】 高見澤 一裕
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所
【氏名】 岩橋 均
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府吹田市垂水町3丁目28番33号 松下環境空調エンジニアリング株式会社内
【氏名】 伊藤 善孝
【特許出願人】
【持分】 40/100
【識別番号】 391012257
【氏名又は名称】 岐阜大学長
【特許出願人】
【持分】 35/100
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
【特許出願人】
【持分】 25/100
【識別番号】 591261336
【氏名又は名称】 松下環境空調エンジニアリング株式会社
【代理人】
【識別番号】 110000040
【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
【代表者】 池内 寛幸
【電話番号】 06-6135-6051
【持分の割合】 25/100
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 139757
【納付金額】 5,250円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

下記（1）から（4）のいずれかのポリヌクレオチド。

（1）配列番号1から17のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

（2）前記（1）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

（3）前記（1）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

（4）前記（1）から（3）のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 2】

下記（5）から（8）のいずれかのポリヌクレオチド。

（5）配列番号19から105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

（6）前記（5）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（5）のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

（7）前記（5）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

（8）前記（5）から（7）のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記（1）の配列番号が配列番号1であり、前記（5）の配列番号が配列番号19から25のいずれかである、バクテリア *デハロスピリルム マルチヴォボランス* (*Dehalospirillum multivorans*) を検出するためのDNAプローブ。

【請求項 4】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記（1）の配列番号が配列番号2であり、前記（5）の配列番号が配列番号26から30のいずれかである、バクテリア *デスルフィトバクテリウム フラピエリ* (*Desulfitobacterium frappieri*) を検出するためのDNAプローブ。

【請求項 5】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記（1）の配列番号が配列番号3であり、前記（5）の配列番号が配列番号31から35のいずれかである、バクテリア *アクチノマイセタレス Sm-1* (ロドコッカス sp. Sm-1) (*Actinomycetales Sm-1* (*Rhodococcus sp. Sm-1*)) を検出するためのDNAプローブ。

【請求項 6】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記（1）の配列番号が配列番号4であり、前記（5）の配列番号が配列番号36から40のいずれかである、バクテリア *ロドコッカス ロドコッカス* (*Rhodococcus rhodococcus*) を検出するためのDNAプローブ。

【請求項 7】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記（1）の配列番号が配列番号5であり、前記（5）の配列番号が配列番号41から45のいずれかである、バクテリア *キサントバクター フラバス* (*Xanthobacter flavus*) を検

出するためのDNAプローブであって、およびの塩基配列に由来する請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブ。

【請求項8】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号6であり、前記(5)の配列番号が配列番号46から48のいずれかである、バクテリア マイコバクテリウム L1 (Mycobacterium L1)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項9】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号7であり、前記(5)の配列番号が配列番号49から53のいずれかである、バクテリア デスルフォミクロビウム ノルベギカム (デスルフォヴィブリオ バキュラタス) (Desulfomicrobium norvegicum (Desulfovibrio baculatus))を検出するためのDNAプローブ。

【請求項10】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号8であり、前記(5)の配列番号が配列番号54から57のいずれかである、バクテリア デスルフィトバクテリウム デハロゲナンス (Desulfitobacterium dehalogenans)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項11】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号9であり、前記(5)の配列番号が配列番号58から62のいずれかである、バクテリア デスルフィトバクテリウム ハフニエンス (Desulfitobacterium hafniense)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項12】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号10であり、前記(5)の配列番号が配列番号63から68のいずれかである、バクテリア クロストリジウム フォルミコアセチカム (Clostridium formicoaceticum)を検出するためのDNAプローブで。

【請求項13】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号11であり、前記(5)の配列番号が配列番号69から74のいずれかである、バクテリア デスルフロノナス クロロエテニカ (Desulfuromonas chloroethenica)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項14】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号12であり、前記(5)の配列番号が配列番号75から79のいずれかである、バクテリア アセトバクテリウム ウッディ DSM 1030 (Acetobacterium woodii DSM 1030)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項15】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号13であり、前記(5)の配列番号が配列番号80から86のいずれかである、バクテリア デハロバクター レストリクタス (Dehalobacter restrictus)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項16】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号14であり、前記(5)の配列番号が配列番号87から91のいずれかである、バクテリア デスルフィトバクテリウム sp. PCE1 (Desulfitobacterium sp. strain PCE1)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項17】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(

1) の配列番号が配列番号 15 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 92 から 96 のいずれかである、バクテリア デスルフィトバクテリウム フラピエリ TCE1 (Desulfitobacterium frappieri TCE1) を検出するためのDNAプローブ。

【請求項 18】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 16 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 97 から 99 のいずれかである、バクテリア アセトバクテリウム ウッディ DSM 2396 (Acetobacterium woodii DSM 2396) を検出するためのDNAプローブ。

【請求項 19】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 17 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 100 から 105 である、バクテリア デスルフォモニル タイドジェイ DCB-1 (Desulfomonile tiedjei DCB-1) を検出するためのDNAプローブ。

【請求項 20】

請求項 3 から 19 のいずれかに記載のDNAプローブが少なくとも 1 つ基板上に固定されたDNAマイクロアレイ。

【請求項 21】

請求項 3 から 19 に記載のDNAプローブが少なくとも 2 つ以上固定され、少なくとも 2 種類以上の前記バクテリアを同時に検出できる請求項 20 に記載のDNAマイクロアレイ。

【請求項 22】

バクテリアを検出するためのキットであって、請求項 3 から 19 に記載のDNAプローブの少なくとも 1 つのDNAプローブと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キット。

【請求項 23】

バクテリアを検出するためのキットであって、請求項 20 または 21 に記載のDNAマイクロアレイと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キット。

【請求項 24】

バクテリアの検出方法であって、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法によりターゲットを調製し、前記ターゲットと請求項 3 から 19 に記載のDNAプローブによりハイブリダイズさせることにより前記試料中のバクテリアを検出する方法。

【請求項 25】

バクテリアの検出方法であって、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法によりターゲットを調製し、前記ターゲットと請求項 20 または 21 に記載のDNAマイクロアレイとをハイブリダイズさせることにより前記試料中のバクテリアを検出する方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】微生物検出用ポリヌクレオチド

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物の検出用ポリヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

テトラクロロエチレン（PCE）およびトリクロロエチレン（TCE）をはじめ、各種の有機塩素化合物による地下水や土壤の汚染は、世界共通の深刻な問題であり、しばしば新聞紙上等のマスコミでも詳細に取り上げられ、これらの物質による環境汚染を修復するための技術開発が社会的に強く要求されている。

【0003】

汚染環境修復技術として、物理化学的方法と生物的方法とがあげられるが、低濃度汚染の修復には、微生物を用いる生物的環境修復方法（バイオレメディエーション）が特に適している。バイオレメディエーションは、土壤の掘削が必要なく、建造物下の環境修復も容易であること、低コストで環境負荷が少ないとから、その実用化への期待が大きい。

【0004】

バイオレメディエーションの方式には、汚染された土壤や地下水に元来生息する微生物に、例えは、各種栄養物質等を供給し、微生物の持つ環境汚染物質の分解除去能力を増強させる方法（バイオスティミュレーション）と、環境汚染物質を分解除去する能力を持つ微生物を汚染環境に直接導入する方法（バイオオーギュメンテーション：例えは、特許文献1参照）とがある。TCEに汚染された地下水の環境修復を、バイオスティミュレーションとバイオオーギュメンテーションにより行い、優れた成果をあげた例もある。

【0005】

バイオレメディエーションを適用するにあたり、その汚染サイトがバイオスティミュレーション可能か、あるいは、系外から汚染物質分解能力を持つ微生物を導入するバイオオーギュメンテーションを適用しなければならないかの判定を迅速に行うことが望まれている（例えは、特許文献2参照）。

【特許文献1】特開2003-154332号公報

【特許文献2】特開2000-079000号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、バイオレメディエーションの適用において、どの方式を適用すべきか判定可能とするポリヌクレオチドの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

前記目的を達成するために、本発明のポリヌクレオチドは、下記（1）から（4）のいずれかのポリヌクレオチドである。

（1）配列番号1から17のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

（2）前記（1）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

（3）前記（1）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

（4）前記（1）から（3）のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【発明の効果】

【0008】

本発明者らは、PCEの分解に関する嫌気性バクテリアの検出方法について鋭意研究を重ねた結果、前記バクテリアは、それぞれ、リボゾーマルDNAの16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS)領域に多様性に富む特有の塩基配列を有することを見出した。そして、この塩基配列をDNAプローブとして、例えば、DNAチップ等の遺伝子検出技術に利用することによって、前記バクテリアの迅速な検出が可能であることを見出し、本発明に到達した。

【0009】

なお、本発明のポリヌクレオチドにおける配列番号1から17の塩基配列は、後述するPCE分解に関する17種類の嫌気性バクテリアのITS配列であり、本発明者らが初めて決定した配列である。

【0010】

本発明のポリヌクレオチドからなるポリヌクレオチドをDNAプローブとして使用すれば、例えば、汚染環境中の嫌気性PCE分解関連バクテリアの少なくとも17種を迅速に検出できる。また、現在報告のある嫌気性PCE分解関連バクテリア18種の残りの1種のバクテリアについても公知のITS配列からDNAプローブを作製でき、これ併用すれば、前記18種すべてを一度に検出することが可能となる。また、前記DNAプローブを用いて、例えば、DNAマイクロアレイを作製すれば、前記検出がより一層簡便かつ迅速にすることができる。

【0011】

したがって、本発明のポリヌクレオチドによれば、汚染環境中のPCE分解関連バクテリアを迅速に検出し、前記汚染環境が有するPCEおよびその脱塩素化物を除去する能力を知ることができるから、例えば、バイオレメディエーションにおけるバイオステイミュレーションが可能か否かの判定が容易にできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明のポリヌクレオチドは、上記(1)から(4)のポリヌクレオチドの一部であるポリヌクレオチドであってもよく、例えば、下記(5)から(8)のいずれかのポリヌクレオチドであってもよい。

(5) 配列番号19から105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(6) 前記(5)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(5)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリングエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(7) 前記(5)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(8) 前記(5)から(7)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【0013】

本発明のDNAプローブは、下記AからQのいずれかのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

A：デハロスピリルム マルチヴォボランス (Dehalospirillum multivorans)

B：デスルフィトバクテリウム フラピエリ (Desulfitobacterium frappieri)

C：アクチノマイセタレス Sm-1 (ロドコッカス sp. Sm-1) (Actinomycetales Sm-1 (Rhodococcus sp. Sm-1))

D：ロドコッカス ロドコッカス (Rhodococcus rhodococcus)

E：キサントバクター フラバス (Xanthobacter flavus)

F：マイコバクテリウム L1 (Mycobacterium L1)

G：デスルフォミクロビウム ノルベギカム (デスルフォヴィブリオ バキュラタス) (

Desulfomicrobium norvegicum (Desulfovibrio baculatus)

H : デスルフィトバクテリウム デハロゲナンス (Desulfobacterium dehalogenans)
 I : デスルフィトバクテリウム ハフニエンス (Desulfobacterium hafniense)
 J : クロストリジウム フォルミコアセチカム (Clostridium formicoaceticum)
 K : デスルフロノナス クロロエテニカ (Desulfuromonas chloroethenica)
 L : アセトバクテリウム ウッディ DSM 1030 (Acetobacterium woodii DSM 1030)
 M : デハロバクター レストリクタス (Dehalobacter restrictus)
 N : デスルフィトバクテリウム sp. PCE 1 (Desulfobacterium sp. strain PCE1)
 O : デスルフィトバクテリウム フラピエリ TCE 1 (Desulfobacterium frappieri TC
 E1)
 P : アセトバクテリウム ウッディ DSM 2396 (Acetobacterium woodii DSM 2396)
 Q : デスルフォモニル タイドジェイ DCB-1 (Desulfomonile tiedjei DCB-1)

【0014】

具体的には、本発明のDNAプローブの一態様は、前記Aのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号1および配列番号19から25のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。ここで、配列番号1に由来する本発明のポリヌクレオチドとは、前記(1)の配列番号が配列番号1である前記(1)から(4)のいずれかのポリヌクレオチドを意味する。

【0015】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Bのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号2および配列番号26から30のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0016】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Cのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号3および配列番号31から35のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0017】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Dのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号4および配列番号36から40のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0018】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Eのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号5および配列番号41から45のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0019】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Fのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号6および配列番号46から48のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0020】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Gのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号7および配列番号49から53のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0021】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Hのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号8および配列番号54から57のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0022】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Iのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号9および配列番号58から62のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0023】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Jのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号10および配列番号63から68のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0024】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Kのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号11および配列番号69から74のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0025】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Lのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号12および配列番号75から79のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0026】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Mのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号13および配列番号80から86のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0027】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Nのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号14および配列番号87から91のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0028】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Oのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号15および配列番号92から96のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0029】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Pのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号16および配列番号97から99のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

【0030】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Qのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号17および配列番号100から105のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブある。

【0031】

本発明のDNAマイクロアレイは、本発明のDNAプローブが少なくとも1つ基板上に固定されたDNAマイクロアレイである。本発明のDNAマイクロアレイは、少なくとも2つ以上の本発明のDNAプローブが固定され、前記AからQのバクテリアの少なくとも2種以上を同時に検出できることが好ましい。

【0032】

本発明のバクテリアの検出キットは、前記AからQのバクテリアの少なくとも1種を検出するためのキットであって、少なくとも1つの本発明のDNAプローブと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。

【0033】

本発明のバクテリアの検出キットは、その他の態様として、前記AからQのバクテリアの少なくとも1種を検出するためのキットであって、本発明のDNAマイクロアレイと、前記DNAマイクロアレイにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。

【0034】

本発明のバクテリアの検出方法は、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法

によりターゲットを調製し、前記ターゲットと本発明のDNAプローブに少なくとも1つとをハイブリダイズさせることにより前記試料中のバクテリアを検出する方法である。

【0035】

本発明のバクテリアの検出方法は、その他の態様として、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法によりターゲットを調製し、前記ターゲットと本発明のDNAマイクロアレイとをハイブリダイズさせることにより前記試料中のバクテリアを検出する方法である。

【0036】

まず、本発明のポリヌクレオチドの一つを構成する配列番号1から17の塩基配列について説明する。配列番号1から17の塩基配列は、それぞれ、嫌気性PCE分解関連バクテリアである前記AからQのバクテリアのITS配列に相当する配列である。前記ITS配列は、原核生物の16S-23S ITS配列を意味する。原核生物のリボソームRNA配列は、原核生物の16S-23S rRNA配列を意味する。通常、16S rRNAは、通常、1A (rRNA) である16S rRNA、23S rRNAおよび5S rRNAは、通常、一つの転写単位 (オペロン) として転写されるため、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子は隣り合ってゲノム上に配置されている。この16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子との間の領域が、16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS) と呼ばれる領域である。本発明者らは、前記AからQのバクテリアにおける前記ITSの配列を初めて決定し、このITS配列であれば、前記AからQのバクテリアのそれぞれに特有のDNAプローブが作製できることを初めて見出したのである。

【0037】

したがって、本発明のポリヌクレオチドとしては、下記(1)から(4)のいずれかのポリヌクレオチドがあげられる。

(1) 配列番号1から17のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(2) 前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3) 前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(4) 前記(1)から(3)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【0038】

また、本発明者らは、前記ITS配列(配列番号1から17)の一部も、前記バクテリアAからQのDNAプローブとして使用できることも見出した。したがって、本発明のポリヌクレオチドは、前記(1)から(4)のポリヌクレオチドの一部であるポリヌクレオチドであってもよく、例えば、下記(5)から(8)のいずれかのポリヌクレオチドであってもよい。

(5) 配列番号19から105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(6) 前記(5)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(5)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(7) 前記(5)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(5)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(8) 前記(5)から(7)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【0039】

ここで、欠失、置換もしくは付加が可能な塩基数としては、例えば、40塩基に対して

、欠失・付加で、1個～6個であり、1個～3個が好ましく、より好ましくは1個～2個であり、置換で、1個～4個であり、1個～2個が好ましく、より好ましくは1個である。ハイブリダイズする前記ストリンジエントな条件としては、例えば、配列番号で示された塩基配列のTm値の±10℃があげられる。また、前記相同性としては、例えば、90%以上であり、95%以上が好ましく、より好ましくは、97.5%以上である。

[0 0 4 0]

次に、本発明のDNAプローブについて説明する。本発明のDNAプローブは、前記AからQのバクテリアのいずれかを検出できるDNAプローブであって、本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。本発明のDNAプローブとしては、前記バクテリアAからQのITS配列全体（配列番号1から17）よりもその一部の塩基配列に由来するものが好ましい。DNAプローブは、通常、その長さが短くなるほど配列特異性が増し、信頼度が向上するからである。一方、配列自体が前記バクテリアそれぞれに対して特有である必要がある。したがって、DNAプローブの長さとしては、特に制限されないが、例えば、10塩基から前記ITS配列全体であり、40～80塩基が好ましい。

【0 0 4 1】

前記バクテリアAからQのITS配列全体（配列番号1から17）の一部である40塩基配列の具体例が、配列番号19から105の塩基配列であって、配列番号19から25が配列番号1の一部に該当し、配列番号26から30が配列番号2の一部に該当し、配列番号31から35が配列番号3の一部に該当し、配列番号36から40が配列番号4の一部に該当し、配列番号41から45が配列番号5の一部に該当し、配列番号46から48が配列番号6の一部に該当し、配列番号49から53が配列番号7の一部に該当し、配列番号54から57が配列番号8の一部に該当し、配列番号58から62が配列番号9の一部に該当し、配列番号63から68が配列番号10の一部に該当し、配列番号69から74が配列番号11の一部に該当し、配列番号75から79が配列番号12の一部に該当し、配列番号80から86が配列番号13の一部に該当し、配列番号87から91が配列番号14の一部に該当し、配列番号92から96が配列番号15の一部に該当し、配列番号97から99が配列番号16の一部に該当し、配列番号100から105が配列番号17の一部に該当する。

[0 0 4 2]

現在、PCEの分解に関する嫌気性バクテリアとして報告されている嫌気性バクテリアは18種であり、前記AからQの17種のバクテリアと下記Rのバクテリアである。なお、前記AからQのバクテリアは、以下に示す生物資源保存機関ATCCまたはDSMZの寄託番号が付されている。

B · Dehalococcoides ethenogenes 195

R : *Brachyspira pilosicollis* Strain 14466 A : DSM 12446 B : DSM 13498 C : ATCC 51239 D : ATCC 21197 E : DSM 10330

A : DSM 12446 B : DSM 15490 C : ATCC 51176 D : DSM 12447 E : DSM 6695 F : DSM 1741 G : DSM 9161 H : DSM 10644 I : DSM 10644 J : ATCC 27076

F : DSM 6695 G : DSM 1741 H : DSM 9101 I : DSM 10344 O : DSM 12704
 E : DSM 10161 J : DSM 1020 M : DSM 9155

K : DSM 12431 L : DSM 1030 M : DSM 9435 N : DSM 10511 S : DSM

P : DSM 2396 Q : ATCC 49306

前記バクテリアRのゲノム配列は、コーネル大のDr. Zinder氏により配列決定された。

前記バクテリアRのITS配列（配列番号18）および、前記二種類の二種類の

一部からなるポリヌクレオチドのDNAプローブが前記バクテリアRに特異的である。

一部からなるボックスアレイにより、前記18種のバクテリアの全てを検出できる。

発明のDNAノローナーと併用すれば、前記の性質を初めて見出したのである。

ロープとする

【0043】前記バクテリアR用のDNAプローブとしては、下記(9)から(12)のいずれかの前記バクテリアR用のDNAプローブがある。

（9）前記バクテリア R の I T S 配列である配列番号 18 の塩基配列またはその一部である配列番号 106 から 115 のいずれかの 40 塩基の塩基配列からなるポリヌクレオチド

° (10) 前記 (9) のポリヌクレオチドの塩基配列の 1 個から数個の塩基が、缺失、置換

もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(9)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリングエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(11) 前記(9)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(9)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(12) 前記(9)から(11)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【0044】

次に、本発明のDNAマイクロアレイについて説明する。本発明のDNAマイクロアレイは、本発明のDNAプローブが少なくとも一つ基板上に固定されたものであり、好ましくは、2種類以上の本発明のDNAプローブが固定され、2種以上の前記バクテリアが検出できるDNAマイクロアレイであって、より好ましくは、前記バクテリアAからRのそれぞれに対応するDNAプローブが固定されたDNAマイクロアレイである。前記18種類に対応する本発明のDNAプローブが固定されたDNAマイクロアレイであれば、一度にDNAプローブは、ノイズを抑えるため長さが短いほうが好ましく、また、Tm値を一定にすることでクロスハイブリを抑制するためにそれぞれの長さをそろえることが好ましい。前記バクテリアAからQを検出するための本発明のDNAプローブとしては、例えば、配列番号19から105の塩基配列に由来するDNAプローブを使用でき、前記バクテリアRを検出するためのDNAプローブとしては、例えば、配列番号106から115の塩基配列に由来するDNAプローブが使用できる。前記基板としては、特に制限されず、市販のDNAマイクロアレイ用基板等が使用でき、前記基板上へのDNAプローブの固定方法は、特に制限されず、従来公知の方法を適用できる。

【0045】

次に、本発明のバクテリアの検出キットは、前記AからRのバクテリアを検出するためのキットであって、少なくとも1つの本発明のDNAプローブと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子增幅用プライマーおよび遺伝子增幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。

【0046】

本発明の検出キットを用いれば、例えば、バクテリアを検出する試料から核酸を抽出し、前記核酸を前記遺伝子增幅用プライマーと前記遺伝子增幅用試薬を用いて遺伝子增幅を行いターゲットを調製し、前記ターゲットを本発明のDNAプローブとハイブリダイゼーションすることで、簡単かつ迅速に、前記試料中の前記AからRのバクテリアを検出できる。前記核酸は、例えば、DNAでもよく、RNAでもよい。本発明のキットは、必要に応じて、核酸抽出用試薬およびフィルターもしくはチップ等を含んでいてもよい。前記ターゲットは、試料中のバクテリアの配列であって、前記DNAプローブの配列の相補配列であり、検出方法に応じた標識をされた前記ターゲットと前記DNAプローブとがハイブリダイズすることで検出可能となる。前記ターゲットの標識方法は、特に制限されず、例えば、前記遺伝子增幅用プライマーに予め標識しておく方法等があげられる。

【0047】

前記遺伝子增幅の方法は、本発明のDNAプローブであるITSを含む領域を增幅できるものであれば、特に制限されず、従来公知の遺伝子增幅方法を使用できる。前記遺伝子增幅方法として、例えば、PCR法を用いる場合、前記遺伝子增幅用プライマーとしては、例えば、センスプライマーとして配列番号116の塩基配列からなるプライマーを使用でき、アンチセンスプライマーとして、前記バクテリアR以外には、配列番号117の塩基配列からなるプライマーを使用でき、前記バクテリアRには、配列番号118の塩基配列からなるプライマーを使用できる。また、前記遺伝子增幅用試薬としては、従来公知の試薬が利用でき、例えば、バッファー、ポリメラーゼ、ヌクレオチド等があげられる。

【0048】

前記ターゲットと本発明のDNAプローブとをハイブリダイズさせる方法は、特に制限されず、例えば、サザンプロット、DNAアレイ、DNAマイクロアレイ、DNAチップ等、従来公知の遺伝子検出技術を利用できる。これらのなかでも、本発明のマイクロアレイを使用することが好ましく、前記18種のバクテリアが検出可能な本発明のマイクロアレイを使用することがより好ましい。したがって、本発明のキットの好ましい態様としては、本発明のDNAマイクロアレイと、前記DNAマイクロアレイにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。

【0049】

次に、本発明のバクテリアの検出方法は、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法によりターゲットを調製し、前記ターゲットと本発明のDNAプローブとをハイブリダイズさせることにより前記試料中から前記AからRのバクテリアを検出する方法である。ハイブリダイズの方法は、特に制限されず、例えば、サザンプロット、DNAアレイ、DNAマイクロアレイ、DNAチップ等、従来公知の遺伝子検出技術を利用できる。これらの中でも、前記AからRの全てのバクテリアを検出できる本発明のDNAマイクロアレイを使用する方法が好ましい。本発明の検出方法は、例えば、前述した本発明のキットを用いて行うことができる。

【0050】

一般に、PCEは、例えば、図3Aに示すとおり、PCEから、TCE、ジクロロエチレン(DCE)、ビニルクロライド(VC)と、この順で脱塩素化され、前記VCは、エテンまたは二酸化炭素に分解される。前記AからRのバクテリアのPCEおよびその脱塩素化物に対する分解活性を、図3Bに示す。図3Bに示すとおり、前記AからRのバクテリアのPCEおよびその脱塩素化物に対する分解活性は様々である。例えば、前記バクテリアのPCEを、エテンまで一つずつ脱塩素化していくが、前記バクテリアM、AおよびGは、PCEを、シス型のDCEに分解する。

【0051】

したがって、本発明のポリヌクレオチドを用いて、PCEやTCEで汚染された環境中の前記AからRのバクテリアを検出すれば、検出された前記バクテリアのPCEおよびその脱塩素化物に対する脱塩化能力に基づき、前記環境のPCEまたはTCEの除去能力を判定することが可能となる。前記環境としては、特に制限されず、例えば、汚染された土壤、地下水、池、海水等があげられる。

【0052】

バイオレメディエーションを適用するにあたり、前述のように本発明のポリヌクレオチドを用いて汚染環境のPCEおよびその脱塩素化物の除去能力を判定できれば、例えば、バイオスティミュレーションが可能か、または、バイオオーギュメンテーションが必要かの判定が容易となる。例えば、バクテリアRが検出されれば、前記バクテリアRでPCEの判定が容易となる。また、例えば、バクテリアKとCとが検出された場合も、前記2種のバクテリアでPCEを二酸化炭素に分解できるから、バイオスティミュレーションが選択できる。

【0053】

さらに、PCEの分解は、好気性条件では困難であると考えられており、また、通常、地表より50cm以下は嫌気性であると考えられるから、例えば、PCE汚染環境や地表50cm以下の汚染環境を、本来利用可能な嫌気性バクテリアではなく好気性バクテリアで修復することは、余分なコストの投入となる場合があるが、本発明のポリヌクレオチドによれば、前記嫌気性バクテリアを容易かつ迅速に検出できるから、例えば、PCE汚染環境や、地表50cm以下の汚染環境を修復する際に、好気性バクテリアを利用することによる余分なエネルギーの使用を回避することが可能となる。

【0054】

以下に、本発明の実施例について説明する。

【実施例 1】

[0 0 5 5]

(DNAプローブの作製)

前記バクテリアAからRのITS配列（配列番号1から18）から、40塩基からなる配列をデザインし、DNAマイクロアレイのDNAプローブとした。前記DNAプローブのデザインは、40塩基、GC含有量48-50%の一本鎖であり、相補性がないかまたはほとんどなく、国際データベースGenBankでヒットがない（あっても2以上のミススペア）ことを基準として行った。その結果、前記各バクテリアについてそれぞれ3から10のDNAプローブを作製した（配列番号19から115）。

[0 0 5 6]

【0036】 バクテリアAのプローブA 1からA 7が、それぞれ、配列番号1 9から2 5の塩基配列であり、バクテリアBのプローブB 1からB 5が、それぞれ、配列番号2 6から3 0の塩基配列であり、バクテリアCのプローブC 1からC 5が、それぞれ、配列番号3 1から3 5の塩基配列であり、バクテリアDのプローブD 1からD 5が、それぞれ、配列番号3 6から4 0の塩基配列であり、バクテリアEのプローブE 1からE 5が、それぞれ、配列番号4 1から4 5の塩基配列であり、バクテリアFのプローブF 1からF 3が、それぞれ、配列番号4 6から4 8の塩基配列であり、バクテリアGのプローブG 1からG 5が、それ配列番号4 9から5 3の塩基配列であり、バクテリアHのプローブH 1からH 4がぞれ、配列番号5 4から5 7の塩基配列であり、バクテリアIのプローブI 1から、それぞれ、配列番号5 8から6 2の塩基配列であり、バクテリアJのプローブJ 1からJ 5が、それぞれ、配列番号6 3から6 8の塩基配列であり、バクテリアKのプローブK 1からK 6が、それぞれ、配列番号6 9から7 4の塩基配列であり、バクテリアLのプローブL 1からL 5が、それぞれ、配列番号7 5から7 9の塩基配列であり、バクテリアMのプローブM 1からM 7が、それぞれ、配列番号8 0から8 6の塩基配列であり、バクテリアNのプローブN 1からN 5が、それぞれ、配列番号8 7から9 1の塩基配列であり、バクテリアOのプローブO 1からO 5が、それぞれ、配列番号9 2から9 6の塩基配列であり、バクテリアPのプローブP 1からP 3が、それぞれ、配列番号9 7から9 9の塩基配列であり、バクテリアQのプローブQ 1からQ 6が、それぞれ、配列番号1 0 0から1 0 5の塩基配列であり、バクテリアRのプローブR 1からR 1 0が、それぞれ、配列番号1 0 6から1 1 5の塩基配列である。

【0057】

(DNAマイクロアレイの作製とDNAプローブの特異性の確認)

次に、前記97種類のDNAプローブを、Affymetrix 417 Arrayerにより、Takara Hubble Slideにカスタムプリントし、DNAマイクロアレイを作製した。そして、ターゲットを前記AからRのバクテリアからそれぞれ調製し、そのターゲットを前記DNAマイクロアレイとハイブリダイズすることで、DNAプローブの特異性を確認した。

[0058]

前記ターゲットは、前記バクテリアのITS領域をPCR法で増幅して調製した。前記PCRにおいて、センスプライマーとして配列番号116の塩基配列からなる非標識プライマーを使用し、アンチセンスプライマーとして前記バクテリアR以外には配列番号117の塩基配列からなるCyt3標識プライマーを使用し、前記バクテリアRには配列番号118の塩基配列からなるCyt3標識プライマーを使用した。PCRの反応条件は、標準的なプロトコールに従った。

[0 0 5 9]

とも4時間配置した。その後、前記DNAマイクロアレイを、0.2×SSC、0.2%SDSで5分間、0.2×SSCで5分間、そして、0.05×SSCで数秒間洗浄し、1,800 rpmでスピンドライし、Scanarry version 5 (パーキンエルマージャパン社製) でスキャンした。

【0060】

その結果をまとめたものを図1に示す。図1は、縦軸に示された18のバクテリアのITS配列のターゲットと、横軸に示す97のDNAプローブとハイブリダイズしたかどうかを示すグラフであり、黒塗りの部分が、500蛍光ユニット以上のシグナルを示してDNAプローブとターゲットとがハイブリダイズしたことを示す。なお、横軸の系統樹は、ITS配列のアライメントから作製したものである。図1に示すとおり、前記AからRのバクテリアそれぞれから調製したターゲットは、クロスハイブリダイズすることなく、前記AからRのバクテリアのDNAプローブのみと有意にハイブリダイズすることが示された。

【実施例2】

【0061】

T.H. Lee博士（韓国）の提供による嫌気的集積培養試料を用いて、下記96種類のDNAプローブを配置したDNAマイクロアレイを用いて検出した。まず、前記嫌気性集積培養試料からFastPrep bead-beater and soil DNA extraction kit (Q Bionene社製) を用い、取扱い説明書に従って、DNAを抽出した。前記DNAから、実施例1と同様のプライマーを用いてPCR法によりターゲットを調製し、実施例1と同様の条件で前記DNAマイクロアレイとハイブリダイズした。

【0062】

その結果、バクテリアA、J、M、NおよびOの一部のプローブに強いシグナルが検出され、バクテリアBおよびIのプローブからも弱いシグナルが検出された。その結果を図2に示す。図2および図3Bから前記試料には、PCEをcisDCEに変換するバクテリアが存在することが示されるが、これは、T.H. Lee博士による前記集積培養のPCE/cisDCEの分析データと一致する内容であった。

【産業上の利用可能性】

【0063】

以上、説明したとおり、本発明のポリヌクレオチドは、PCE分解関連バクテリアの検出に有用であり、例えば、汚染環境の修復方法、とりわけ、バイオレメディエーションの分野で有用である。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1は、本発明の一例におけるDNAマイクロアレイによる検出結果を示す図である。

【図2】図2は、本発明のその他の例におけるDNAマイクロアレイによる検出結果を示す図である。

【図3】図3は、本発明に関わる嫌気性PCE分解関連バクテリアの分解活性を説明する図である。

【配列表フリーテキスト】

【0065】

配列番号116 PCR用センスプライマー27F

配列番号117 PCR用アンチセンスプライマー132R

配列番号118 PCR用アンチセンスプライマー341R

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Gifu University
 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
 Matsushita Environmental & Air-conditioning Engineering Co.,Ltd.

<120> ITS sequence of PCE degrading bacteria

<130> 8009150035

<160> 118

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 742
<212> DNA
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 1
aagtgcgtaac aaggtaaccg taggagaacc tgcgggttggaa tcaccctcctt tcttagatgtat 60
aggggcacta tctcacaatgt gtgcgtccggc gagcatagct agggaaagctt atttagtttt 120
gagagattga atgaaaaaagg ggcttatagc tcaggtggtt agagcgtacc cctgataagg 180
gtaaggtcag aggttcgagt cctcttaagc ccaccatggg gaattagctc agctgggaga 240
gcgcctgctt tgcacgcagg aggtcagcgg ttcgatcccg ctattctcca ccattttta 300
gagaaatggt gaaagattgc caagagacat tgtagtgag aatgaagaca caatgtctaa 360
tataagaaca atttagtttgc tttttatattt agactttta gtctaagttt atgttctaca 420
atttagaata cgacgcatttgc tgggtgtctg taggtttgggt tcttttaagat agctttgcta 480
tctggtaaaa gaacataaaag atgttattttt atttattttt gtcaaagtca acaaaacgca 540
aaaaaaacaa ttacaactt gtttagatgtt ttacatttaa taagggagtg aaatgtgcat 600
tagaatacaa ataggtaagc tattaaagagc gaatgggtggaa tgcctaggct gtaagaggcg 660
atgaaggacg tactagactg cgataaggta cggggagctg tcaagaagct ttgatccgta 720
aatttccgaa tggggcaacc ca 742

<210> 2
<211> 527

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 2	
aagtctgtac aaggtagccg tattcgaaagg tgcggctgga tcacccctt tctaaggaga	60
catgttcaact ctggaagtga gcatatccta aggtcgatgc tttgaaggac gtcacggaag	120
agatgaagtgc aaacggttca aagctggaga agtctgaaga gacttcgaaa tgccgaagag	180
gcaaaaggcagg ggaaatctgc ataagatgac cctgaaatcg agtcaaacct gttcaagcgc	240
aagcttactt gttgttttagt tttgagggac cagcaatgga aactcattat tttttgacc	300
aaaagtcaag aaaaactgtt ctttggaaaac tgcacagaga agaaaaaaact gtaattttagg	360
ataacatctg aaaaacctga atgtggcgga gacgttttgtt caagctacta agggcgtacg	420
gtggatgcct aggcgctaag agtcgaagaa ggacgcggcg agcggcgaaa cgccacgggg	480
agcagtaagc atgcttgat ccgtggatata ccgaatgggg caacccca	527

<210> 3

<211> 478

<212> DNA

<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 3	
aagtctgtac aaggtagccg taccggaaagg tgcggctgga tcacccctt tctaaggaga	60
aactcccgac ggtgggtcac acaggtgact ccggccacggg cagagccatt tcggattcac	120
acgtaatccg gtgggtgctca tgggtggaaac gctgacagct acttctcgac cgggtcccg	180
ttctgtgcgg gatccgagga gttatatcggt tgcactgttg ggtcctgaga gaacacgcga	240
gtgtttgtc agcgacgatg atccgcgaaa caagaggaca tggtttctt gcggtagggg	300
ttgttggtg ttgttgaga actgcacagt ggacgcgagc atctttgttg taagtgttt	360
tgagcgtacg gtggatgcct tggcaccagg agccgatgaa ggacgtggga ggctgcgata	420
tgcctcgaaa agctgtcaac cgagctgtga tccgaggatt tccgaatggg gcaacccca	478

<210> 4

<211> 478

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 4
 aagtctaac aaggtagccg taccggaagg tgcggctgga tcacccctt tctaaggacg 60
 aactccttgc tcggaccagc acacaggtgc cgggggagcg aggcagagcc atttcggatt 120
 cacacgtaat ccgggtggtgc tcatgggtgg aacgctgaca gtcatcaccg cgccggagg 180
 acccgagtgt ccttctgcgg tggttatatc ggtgcactgt tgggtcctga gagaacacgc 240
 gagtgtttg tcagcgacga tgatcggaa cgaaggggtt gtttcttctt ccggtaccgg 300
 ttgttgtgtg ttgttgaga actgcacagt ggacgcgagc atcttggta taagtgttta 360
 tgagcgtacg gtggatgcct tggcaccagg agccgatgaa ggacgtggaa ggctgcgata 420
 tgcctcgggg agctgtcaac cgagctgtga tccgaggatt tccgaatggg gaaaccca 478

<210> 5
 <211> 952
 <212> DNA
 <213> Xanthobacter flavus

<400> 5
 aagtctaac aaggtagccg tagggaaacc tgcggctgga tcacccctt tctaaggacg 60
 atccctcagt attgagactt cggctcgat ctatcgatc tttcagaaa catcagccgg 120
 acatagggtgg aaacatcatg atctggcatt ggcgggacac cgccgtttc gtttctctt 180
 ctgcggac aagctgacg cccaggttgc ggtccttgg actgcgttcc gtttccggc 240
 ctgtagctca ggtggtaga ggcacccct gataagggtg aggtcggacg ttgcagtcgt 300
 cccaggccca ccaccatcag acagtttttgc cctgcgcctc atgtccgaag cttcgcaac 360
 tctgcctgt ggcattctgt gatggggcca tagtcagtt gggagagcgc gtgccttgca 420
 agcatgaggt cgtcggttgc atcccgctg gctccaccat tttcttttc ttgaggaaga 480
 tgcagggttgcg ctcggctcct ttgagtgaag gctcttgggg tcttgagcgt 540
 ctgtccgcg aatatctgtt tcgcattgttccatcatgcccgttccgcg gaacatgcac 600
 ggctgtatga catcgtaat agggcattga tcgactgtac cgtggcaaca cggtcggtc 660
 gtggggagg tggcgacacc tttcgatgcg atcattgggt gctgaccgca ccattgtcga 720
 caatgcgaag ctggctttt caaagaagac gtcgaagccg tccggccggg agcaatcctg 780

gtgcgggcct ctgccgaggg gtgggcatcg acgatgagaa cgatcaagtg tcttaaggc 840
 attcggtgga tgccttggcg ctaagaggcg aagaaggacg tgatacgctg cgataagctt 900
 cgggagccg cgaatggcgt ttgatccgga gatttccgaa tggggcaacc ca 952

<210> 6
 <211> 579
 <212> DNA
 <213> *Mycobacterium L1*

<400> 6
 aagtcgtaac aagtagccg taccgaaggt gcggctggat cacccctt ctaaggagca 60
 ccacgagacc tggccggccc gtaaatcgcg ggatcagccg atttcagggc gattcggtgg 120
 atggccctt cacctgttagt ggggtgggggt ctggcgcacg acaagcaaac gaccaggatg 180
 gggacccccc ttgtgggggt tgtctgggtgc tgccaaacac actgttggc tttgagacaa 240
 caggcccgtg cccgggtttc cgggtggctc cgcggcgtgg gggtcggcgt gttgtgcct 300
 cacccgtgt gtgggggtgtg gtgtttgatt tgtggatagt gtttgcgagc atctagcacg 360
 caaatgtggc tctcgaggct ttcgggtctg ggggggtgtt ttgtgtgc ttgtatgtgca 420
 gttctttt tcgaatttgtt ttttgtgtt gtaagtgtt aaggcgcatt ggtggatgcc 480
 ttggcactgg gagccgatga aggacgtggg aggctgcgtt atgcctcggg gagctgtcaa 540
 ccgagcgtgg atccgaggat gtccgaatgg ggcaaccca 579

<210> 7
 <211> 523
 <212> DNA
 <213> *Desulfomicrobium norvegicum*

<400> 7
 aagtcgtaac aagtagccg tagggaaacc tgccgcgtgg tcaccctcatt atcaagaatt 60
 ctccaaactcg ctatttactt gcaagggtttc ttaccttgc ggttagaaa tggcgttgc 120
 gctcagggtgg tttagagcgca cgcctgataa gcgtgaggc ggaagttcaa gtcttcccag 180
 gcccaccatt tcttagtggg ggtgttagctc agctgggaga ggcgcctgcct tgcacgcagg 240
 aggtcatcag ttgcgtatcctg ttcaccccca ccattttcca actcgacaag aatttatgtt 300

gctagtctt atcgtcagag tgtctttga cactatggcg cccaaggata gcagcttgtg 360
 atcattgaca gacgaatagg tgaagagaag agagtttaga tgttaaggc atacggtgga 420
 tgccttggcg tcaggaggcg atgaaggacg tggaaggctg cgataagcct cggggagccg 480
 tcaagcaggc tttgatccgg ggatttccga atggggcaac cca 523

<210> 8
 <211> 662
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 8
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgccgttggc tcacccctt tctaaggaga 60
 catggtttct cgcttagagaa atcatatcct aagtcgtatg ctttgaagaa cgtcacggaa 120
 gcaatgaagt gaaacgattc aaagtcggag aagtcttaag agacttctt taggaaactt 180
 ggcttgtgtg aagcatgagc agaagccata gttgacttat ccacggagtg gaaaaatgcc 240
 gaagaggcaa aacggagcaa tccgtaaagt atggaaatg aagctgttga agttaaaagc 300
 taacttgttg tttagttttg agggaccata aagtcttcta tatggggta tagctcagct 360
 gggagagcac ctgccttgca agcaggggtt cagcggttgc atcccgctt cctccaccat 420
 aatatatctg gtttctctaa tgtttattat gttctttgaa aactgcacag agaagaagaa 480
 aactgttaatt aggataacat ctaaaaccta gaagtggcg caaaaaacgt ttggtaagc 540
 tactaaggcc gtacggtgga tgccttaggcg ctaagagtgc aagaaggacg cggcgagcgg 600
 cggaaacgcca cggggagcag taagcatgcc ttgatccgtg gatatccgaa tggggcaacc 660
 ca 662

<210> 9
 <211> 775
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 9
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgccgttggc tcacccctt tctaaggaga 60
 catgttcaact ctggaaagtga gcatatccta aggtcgatgc tttgaaggac gtcacggaa 120
 出証特 2005-3035338

agatgaagtg aaacggttca aagctggaga agtctataga gacttcgaag tgccgaagag	180
gcaaaggcagg ggaaatctgc ataagatgac cctgaagtgc agtcaaacct gttcaagcgc	240
aagcttactt gttgttagt tttgagagac cataaagtct tctatggct tatacgctag	300
ctggtagag cgacgcctg ataagcgtga ggtcggtggt tcgagtccac ctaggcccac	360
cattattcaa agaggataga gacccgaacc tccaaacaat acttcacgcc agaacatacc	420
taacaggggt gagtatttagt aggggagcgg ctccctctc aacgacatgg ggttatacgct	480
cagctggggg agcacctgcc ttgcaagcag ggggtcagcg gttcgatccc gcttacctcc	540
accatcatat actggttct ctaatgttct ttgaaaactg cacagagaag aaaaaactgt	600
aatttagat aacatctgaa aaacctgaat gtggcggaga cggttggtca agctactaag	660
ggcgtacggt ggtgcctag gcgctaagag tcgaagaagg acgcggcgag cggcgaaacg	720
ccacggggag cagtaagcat gccttgatcc gtggatatcc gaatgggca accca	775

<210> 10
 <211> 422
 <212> DNA
 <213> Clostridium formicoaceticum

<400> 10	60
aagtcgttaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacccctt tctaaggaga	60
aaggctttta ctatactgtt taatttttagt ggactttgt ttctcaataa gcagacaacc	120
aaaatcttag attttgtt agtcgcttag ttaaaaattc tgtaattcac gacaatagtt	180
ttaaaccac aaaaaatgaa tggagaatt tttaacatct atagtcttt agattgttct	240
ttgaaaacta aacaatgata tgagaaaaga aaagctgaag taattcacta aaggtcaagt	300
tattaagggc aaagggtgga tgccttgca ctaggagccg aagaaggacg tggtaagctg	360
cggaaagcca cggggagctg caagcaagta ttgatccgtg gatgtccgaa tggggaaacc	420
ca	422

<210> 11
 <211> 699
 <212> DNA

<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 11
 aagtcgtaac aaggtagccg tagggaaacc tgcggcctgg atcacccct ttctaaggag 60
 cctccttact cgtaagagta aaggcatcct ggtcaatccc tcggcatggt ccgagcggat
 gcccgc aaag catcattgtc tgctat tag tttgagaga ccagaaccc gcaagagg 180
 ttttgttctt tgagacaaga cgaacgaagg tggaagtggg ctagtagctc agctggctag 240
 agcacacgac tgataatcgt gaggtcggag gttcgagtcc tccctggcc accagattat 300
 ttgggggtgt agctcagttg ggagagcgcc tgccttgcac gcaggagg 360
 tcccggtcac ctccaccaga tttctgtca ggagtaagga gagaagagt 420
 ctcaccctaa cgccttacgc ctcaccgatt ttcttgtct ttggcaattt cataagactg 480
 atacgatgca cgaagtaaag cttgcgtac gcaagtacgt gacacgcgaa ggttagcaaca 540
 cgatcgctt agtagaagac tttttatgg tcaagctatt aaggcgatc ggtggatgcc 600
 ttggcatcgg gaggcgatga aggacgtggt aagctgcgaa aagcttcgg 660
 acaggcttg acccgagat gtccgaatgg ggaaaccca 699

<210> 12

<211> 391

<212> DNA

<213> Acetobacterium woodii

<400> 12

aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgg tcacccctt tctaggaaat 60
 acaggaagtc atggtaat tttttttgt atgaccatct gttatgcaa aaacagttaa 120
 agaaggcatc ttaggatgca ttttaacg ggacaaatac cggagtagtg gtagcagg 180
 ccaatcgatc attgaaaaca gcatagtgt 180
 taaataaaat tataaaatac aatttcttaa 240
 cacgaaaacg taaatttata ggtcaagaa gaaaagagca cagggtgaat gccttggcaa 300
 tcagagccga cgaaggacgc gacaagctgc gaaaagctac gtgttaggtgc acataaccgt 360
 taaagcgtat atatccgaat gggcaaccc a 391

<210> 13

<211> 608

<212> DNA

<213> Dehalobacter restrictus

<400> 13

aagtgcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacccctt tctaaggaga	60
accgattgaa gctagacttc aatctactcc aaggtcgta ctttagatggaa agcagtgc	120
actggactga ctctcaagta aggtgagttt agcaattttat ttcttgggtt ttagtttga	180
gtgacctgag cacagtaatg tgtaaaagaa acactcaa atatgtccata catatcagag	240
attctggtaa gtatggaaaa acatccttgt tctttggaaa ctgcacaacg agaaaagcag	300
aatgcgaaat gcgaaagtaa agacaacgaa atggcggtca aattctaaag cgcaaaaact	360
taacgttttc gcgcgtggca aatttgaact taggagcatc tatgctccgt caggtaa	420
ttactaagcg cataggagac attcaaatac tctataacaa gtcgaggaag aaccagaagg	480
tcaagatata aagggcatac ggtggatgcc ttggcgccaa gagccgaaga aggacgcgg	540
taacagcgaa atgccacggg gagtcgtaa caggcataga tccgtggatg tccgaatggg	600
gaaaccca	608

<210> 14

<211> 689

<212> DNA

<213> Desulfobacterium sp. strain PCE1

<400> 14

aagtgcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacccctt tctaaggaga	60
catggtttct cgcttagagaa atcatatcct aaggtcgatg ctttgaagga cgtcatggaa	120
gcaatgaagt gaaacgattc aaagttggag aagtcttaag agacttctga aagccgaaga	180
ggcaaaacgg agcaatccgt aaagtatgag aaatgaagct gttgaagttt aaagctaact	240
tgttggtag ttttggggccataaagtc ttctatggc ttatagctca gctggtaga	300
gcgcacgcct gataagcgtg aggtcggtgg ttcgagtcca cctaggccca ccataaaaaga	360
ttgatattgt ggggtatag ctcagctggg agagcacctg ctttgcacgc agggggtcag	420
cggttcgacc ccgcttacccatccaccataat atatctggtt tctctaatgt ttattatgtt	480

cttgaaaac tgcacagaga agaagaaaac tgtaattagg ataacatcta aaacctagaa 540
 gtggcggcaa aaaacgttg gtcaagctac taagggcgta cggtgatgc ctaggcgcta 600
 agagtcgaag aaggacgcgg cgagcggcga aacgccacgg ggagcagtaa gcatgccttg 660
 atccgtggat atccgaatgg ggcaaccca 689

<210> 15
 <211> 468
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 15
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggagg tgccgtgga tcacccctt tctaaggagt 60
 tcataaggac tcacactgtt ttgttataa atttgattcg ctgaattcc agaatcaatc 120
 acattgaaat ccttgatt tcaattgtt attgtgcact gtgaaatgcg aattgataac 180
 gtgggggtgt agtcagttg ggagagcacc tgcctgcaa gcaggggtc aggagttcga 240
 ctccctcat ctccacccaa gacattcata gttaaatattatgaatt gttaaactg 300
 aacattgaaa actacaaata tacaataaac atgaaatagg tcaagttatt aaggcgtag 360
 ggcgaatgcc ttggcaccaa gagccgatga aggacgggat aagcaccgat atgctcg 420
 gagtcgcaaa tagacattga tccggagatt tccgaatggg gcaaccca 468

<210> 16
 <211> 511
 <212> DNA
 <213> Acetobacterium woodii

<400> 16
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggagg tgccgtgga tcacccctt tctaaggaaa 60
 acagggagtc atggtactat tttttttgt atgaccttta gtttataaa aaggatcgta 120
 gtttctggca attttcttta tttttataaa gatgaaaattt gacataaact gcgttagtt 180
 ttacaccgct catgcgctaa cgcttaatga gctgccaaat tgaaaatttg gttaaaaacg 240
 tcaaagtggt cattgaaaac agcatgtgt attaaaaaaa catacaattt cagatgttaa 300
 caacataaga aaaacgtaaat ttaaaggatc gtagtttag gactacaggc gactgacgaa 360

gttctactgt cagttgttaa ggtcaagaa atgaaggca cagggcggat gccttggcac 420
 tcagagccga tgaaggacgc gacaagctgc gaaaagctgc gtgaaggtgc acataaccgt 480
 tgaagcgcag atatccgaat gggcaaccc a 511

<210> 17
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 17
 aagtcgtaac aaggtagccg tagggtaacc tgcggctgga tcacccctt tctaagggt 60
 aaccttagta tccgaacgca cacatctgct attcagttct gagaggttga cgataacggc 120
 ttcgggccta tagtcagtt cggttagagc gcacgcctga taagcgttag gtcgttggtt 180
 caattccaaac taggcccacc acgcctctat cgggggtgtta gctcagctgg gagagcacct 240
 gcttgcaag caggggtca tcggttcgaa tccgttcacc tccaccagtt cttgacaat 300
 cgaatagggtt ttagatcgag gatactcata tatttaggca atcaagctac taaggccta 360
 cggtgatgc cttggcatcg gaagacgtgg aaggacgtgg ttagctgcga taagcctcgg 420
 ggagttgcta aacacactgt gatccgggaa tttccgaatg gggcaacccca a 471

<210> 18
 <211> 847
 <212> DNA
 <213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 18
 ggactggtaa ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgt gcggaaagctg cggctggatc 60
 acctcccttc taaggataat tggcctcggt cctattaacc taggtcgata tccgacttaa 120
 aacggataact tctctttct ttccgctatc caggggttaa ggtgttagtg ttataagggg 180
 ataaaaattta ctttctcctg attgctaacc tgtatctatc ccgcattgaa actcatgttag 240
 gttttgttag gcattttggg ctgaaggact tgcgctaagc gtcctgtttg ctatattata 300
 ttgacgttt tcgggttagta tttcgaagat acccaatctg tctgtgtta tcaatcgcc 360
 cattagctca gctggtaga gcgcagtccct gataagactg aggtccttgg ttcgagacca 420

agatggccca ccataaagct aaaacttagc ataatcaaac gaataaaaat acctgctgat 480
 taaccggttt ttcgcgagag aaccggttt tttataaaga agcaggaaga taatgtctat 540
 tatttcattt taggtgaata acctgcgctg caaatggta tagtttagta ttcaccgggt 600
 tattggcgg gcaaaaaaat ctttgtgaaa tgaaaatatt tactttaaaa agactgattg 660
 ccggaggtaa tataacagta tgataagtaa tgaaggttca gaaaaagtat tatctccgga 720
 agaacaggct aaattacttg gcctgcttaa agggcgtttt gagcaaaata tacaccgcca 780
 cgagggcatt gtttgggcta aggtgcaaga aaagcttaag gcagataccc ttaaatttgt 840
 gtcattg 847

<210> 19
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalospirillum multivorans

<400> 19
 aggctgttaag aggcgatgaa ggacgtacta gactgcgata 40

<210> 20
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalospirillum multivorans

<400> 20
 gctgttaagag gcgatgaagg acgtactaga ctgcgataag 40

<210> 21
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalospirillum multivorans

<400> 21
 cggttggatc acctcctttc tagagtatag gggcactatc 40

<210> 22
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalospirillum multivorans

<400> 22

gcgggtggat caccccttt ctagagtata ggggcactat

40

<210> 23
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalospirillum multivorans

<400> 23
 tgcggttgaa tcacccctt tctagagtat aggggcacta

40

<210> 24
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalospirillum multivorans

<400> 24
 ggtcagcggt tcgatccgc tattctccac catttttag

40

<210> 25
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalospirillum multivorans

<400> 25
 gaggtcagcg gttcgatccc gctattctcc accattttt

40

<210> 26
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 26
 ctggagaagt ctgaagagac ttcgaaatgc cgaaggaggca

40

<210> 27
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 27
 agctggagaa gtctgaagag acttcgaaat gccgaaggagg

40

<210> 28
 <211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 28

agtctgaaga gacttcgaaa tgccgaagag gcaaagcagg

40

<210> 29

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 29

tgaagagact tcgaaatgcc gaagaggcaa agcaggggaa

40

<210> 30

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 30

gaagagactt cgaaatgccg aagaggcaa gcaggggaaa

40

<210> 31

<211> 40

<212> DNA

<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 31

gcgacgatga tccgcgaaac aagaggacat ggtttcttg

40

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 32

tgatccgcga aacaagagga catggtttc ttgcggtagg

40

<210> 33

<211> 40

<212> DNA

<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 33

caagaggaca tggtttctt gcggtagggg ttgttgtgtg

40

<210> 34
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Actinomycetales Sm-1

<400> 34
 tcagcgacga tcatccgcga aacaagagga catggtttc

40

<210> 35
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Actinomycetales Sm-1

<400> 35
 gaggacatgg ttttcttgcg gtaggggttg ttgtgtgttg

40

<210> 36
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 36
 gtttgcgtcg cgacgtatcg cggaaacgaa ggggttgcgttt

40

<210> 37
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 37
 acgtatcg ggaacgaagg gtttgcgtttct tcttccggta

40

<210> 38
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 38
 ttgtcgtcg acgtatcg ggaacgaagg gtttgcgtttct

40

<210> 39
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 39 tcagcgacga tgatcgaa cgaagggtt gtttcttctt 40

<210> 40

<211> 40

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 40 ggggttggttt cttcttccgg taccgggttgt tgtgtgttgt 40

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Xanthobacter flavus

<400> 41 catcgtgaat agggcattga tcgactgtac cgtggcaaca 40

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Xanthobacter flavus

<400> 42 acatcgtgaa tagggcatttg atcgactgtac ccgtggcaac 40

<210> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> Xanthobacter flavus

<400> 43 ggtcttggc gtcttgtccg cgaatatctg tttcgcatgt 40

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> Xanthobacter flavus

<400> 44 atgacatcgatgt gaataggca ttgatcgact gtaccgtggc 40

<210> 45
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Xanthobacter flavus

<400> 45
 ctcttgggtt cttgagcgctc ttgtccgcga atatctgttt

40

<210> 46
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium L1

<400> 46
 ggtctggggg gtgtgttgt gtgcgtttga tgtgcagttt

40

<210> 47
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium L1

<400> 47
 gtctgggggg tgtgttgtgtg tgctttgtat gtgcagttt

40

<210> 48
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Mycobacterium L1

<400> 48
 attgtcaggc gattcggtgg atggcccttt caccgttagt

40

<210> 49
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 49
 gcgcccaagc atagcagctt gtgatcattg acagacgaat

40

<210> 50
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 50
cagttcgatc ctgttcacct ccaccatttt ccaactcgac 40

<210> 51
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 51
ctatggcgcc caagcatagc agcttgtgat cattgacaga 40

<210> 52
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 52
tatggcgccc aagcatagca gcttgtgatc attgacagac 40

<210> 53
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 53
actatggcgc ccaaggcatag cagcttgtga tcattgacag 40

<210> 54
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 54
acggagtggaa aaaatgccga agaggcaaaa cggagcaatc 40

<210> 55
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 55
cacggagtggaaaatgccg aagaggcaaa acggagcaatc 40

<210> 56
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 56
 tatccacgga gtggaaaaat gccgaagagg caaaaacggag

40

<210> 57
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 57
 agcatgagca gaagccatag ttgacttatac cacggagtgg

40

<210> 58
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 58
 ctggagaagt ctatagagac ttcgaagtgc cgaaggaggca

40

<210> 59
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 59
 agctggagaa gtctatagag acttcgaagt gccgaagagg

40

<210> 60
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 60
 agtctataga gacttcgaag tgccgaagag gcaaaggcagg

40

<210> 61
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 61
tatagagact tcgaagtgc_c gaagaggcaa agcaggggaa 40

<210> 62
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 62
atagagactt cgaagtgc_{cg} aaggcaaa gcagggaaa 40

<210> 63
<211> 40
<212> DNA
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 63
ggtcaagttt ttaaggcaa agggtggatg cttggact 40

<210> 64
<211> 40
<212> DNA
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 64
gtcggttgg atcacccctt ttcttaaggaa aaggcttt 40

<210> 65
<211> 40
<212> DNA
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 65
tgcccaaggc atccaccctt tgcccttaat aacttgacct 40

<210> 66
<211> 40
<212> DNA
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 66
ctcctagtgc caaggcatcc acccttgcc cttaataact 40

<210> 67

出証特 2005-3035338

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Clostridium formicoaceticum

<400> 67
 gcggctggat cacccctt ctaaggagaa aggctttac

40

<210> 68
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Clostridium formicoaceticum

<400> 68
 cctagtgcac aggcatccac ccttgccct taataacttg

40

<210> 69
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 69
 ctgtcaggag taaggagaga agagtggaa gtacacctca

40

<210> 70
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 70
 gtgacacgca aagtagcaa cacgatcgct taagtagaaag

40

<210> 71
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 71
 gagtaaggag agaagagtga ggagtagacc tcaccctaac

40

<210> 72
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 72

出証特 2005-3035338

aggagtaagg agagaagagt gaggagtaca cctcacccta 40

<210> 73
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 73 agtaaggaga gaagagttag gactacacct caccctaacg 40

<210> 74
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 74 gacacgcgaa ggttagcaaca cgatcgctta agtagaagac 40

<210> 75
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Acetobacterium woodii

<400> 75 ttaacggac aaataccgga gtagtgtag caggtccaa 40

<210> 76
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Acetobacterium woodii

<400> 76 ccggagtagt ggttagcaggt cccaatcgat cattgaaaac 40

<210> 77
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Acetobacterium woodii

<400> 77 gacaaatacc ggagtagtgg tagcaggatcc caatcgatca 40

<210> 78
 <211> 40

<212> DNA

<213> Acetobacterium woodii

<400> 78

ttttaacggg acaaataccg gagtagtggtt agcaggtccc

40

<210> 79

<211> 40

<212> DNA

<213> Acetobacterium woodii

<400> 79

tttaacggga caaaataccgg agtagtggtt gcaggtccca

40

<210> 80

<211> 40

<212> DNA

<213> Dehalobacter restrictus

<400> 80

aaggtcaaga tataaagggc atacggtgga tgccttggcg

40

<210> 81

<211> 40

<212> DNA

<213> Dehalobacter restrictus

<400> 81

gaaggtcaag atataaaggc catacggtgg atgccttggc

40

<210> 82

<211> 40

<212> DNA

<213> Dehalobacter restrictus

<400> 82

aagatataaaa gggcatacgg tggatgcctt ggcggcaaga

40

<210> 83

<211> 40

<212> DNA

<213> Dehalobacter restrictus

<400> 83

gcgcgtggca aatttgaact taggagcatc tatgctccgt

40

<210> 84
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalobacter restrictus

<400> 84
 tcaagatata aaggcatac ggtggatgcc ttggcgccaa

40

<210> 85
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalobacter restrictus

<400> 85
 tcgcgcgtgg caaatttgaa cttaggagca tctatgctcc

40

<210> 86
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalobacter restrictus

<400> 86
 cgcggtggcaa atttgaactt aggagcatct atgctccgtc

40

<210> 87
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 87
 gtcacccatggccaccata aaagattgat attgtgggggg

40

<210> 88
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 88
 agattgatata tgtggggta tagtcagct gggagagcac

40

<210> 89
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 89

attgatattg tgggggtata gctcagctgg gagagcacct

40

<210> 90

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 90

agagacttct gaaagccgaa gaggcaaaac ggagcaatcc

40

<210> 91

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 91

gacttctgaa agccgaagag gcaaaacgga gcaatccgta

40

<210> 92

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 92

atgcgaatttg ataacgtggg ggtgtagctc agttgggaga

40

<210> 93

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 93

ggataagcac cgatatgctt cggggagtcg caaatagaca

40

<210> 94

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 94

gatatgcttc ggggagtcgc aaatagacat tgatccggag

40

<210> 95
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 95
 gcaccgatat gcttcgggga gtcgcaaata gacattgatc

40

<210> 96
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 96
 gcactgtgaa atgcgaattg ataacgtggg ggtgttagctc

40

<210> 97
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Acetobacterium woodii

<400> 97
 gtcagttgtt aaggatcaag aaatgaaggg cacagggcgg

40

<210> 98
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Acetobacterium woodii

<400> 98
 gttgttaagg atcaagaaat gaagggcaca gggcggatgc

40

<210> 99
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Acetobacterium woodii

<400> 99
 ttgttaagga tcaagaaatg aagggcacag ggccggatgcc

40

<210> 100
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

出証特 2005-3035338

<400> 100
gattgtcaaa gaactgggtgg aggtgaacgg attcgaaccg 40

<210> 101
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 101
cgattgtcaa agaactggtg gaggtgaacg gattcgaacc 40

<210> 102
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 102
gtcaacctct cagaactgaa tagcagatgt gtgcgttcgg 40

<210> 103
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 103
taaccgaact gagctatagg cccgaagccg ttatcgtcaa 40

<210> 104
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 104
cgtcaaccctc tcagaactga atagcagatg tgtgcgttcg 40

<210> 105
<211> 40
<212> DNA
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 105
ccgaagccgt tatcgtcaac ctctcagaac tgaatagcag 40

<210> 106
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 106
 tgagcaaaat atacaccgcc acgagggcat tgtttggcct 40

<210> 107
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 107
 ttatcaatcg ggccatttagc tcagctggtt agagcgcagt 40

<210> 108
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 108
 cgtcacgtca tgaaagccgg taacacttga agtcgatgtg 40

<210> 109
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 109
 gccgcgtta tacgttagaa gcaagcgtt a cccgattta 40

<210> 110
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 110
 attttggcgtt gaaggacttg cgctaagcgtt cctgtttgct 40

<210> 111
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 111
ctggatcacc tcctttctaa ggataattgg cctcggtc 40

<210> 112
<211> 40
<212> DNA
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 112
gtccttggtt cgagaccaag atggcccacc ataaagctaa 40

<210> 113
<211> 40
<212> DNA
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 113
ggactggtaa ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgta 40

<210> 114
<211> 40
<212> DNA
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 114
tgttggta agtcctgcaa cgagcgcaac cttgttgct 40

<210> 115
<211> 40
<212> DNA
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 115
gtcctgataa gactgaggc cttggttcga gaccaagatg 40

<210> 116
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sense primer 27F for PCR

<400> 116
agagtttgcgtt cctggctcag 20

<210> 117
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Antisense primer 132R for PCR

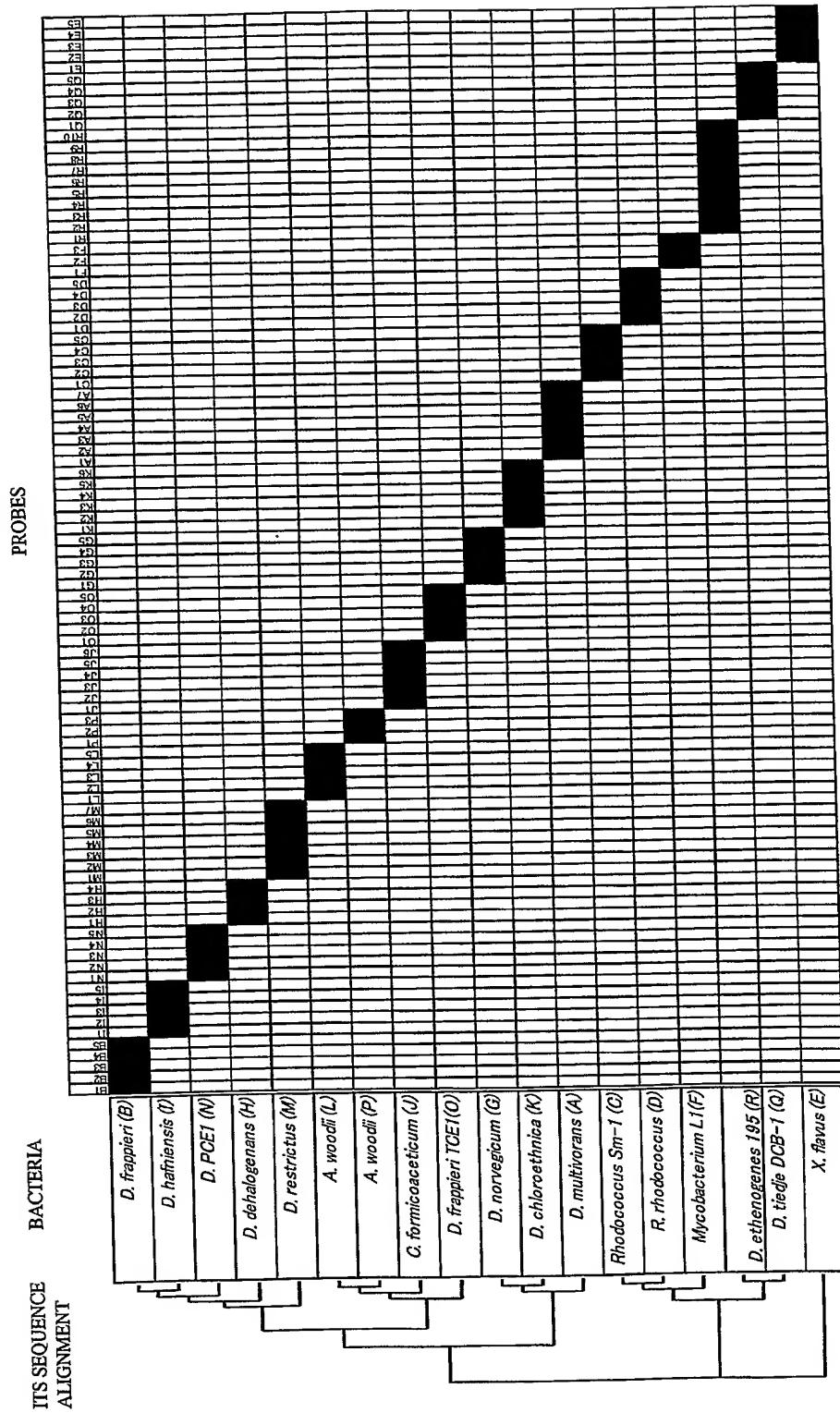
<400> 117 16
gggttbcccc attcrg

<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

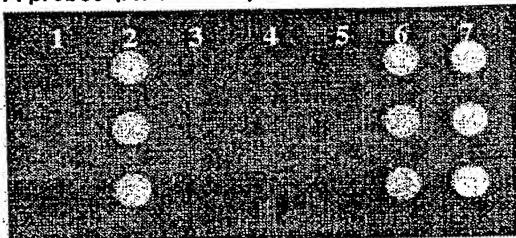
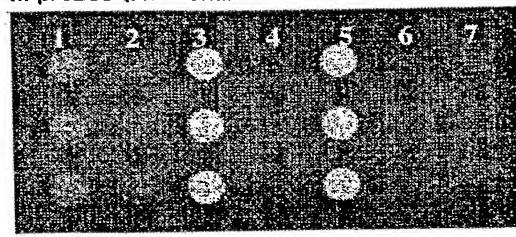
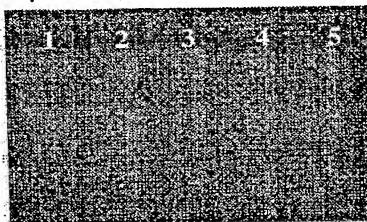
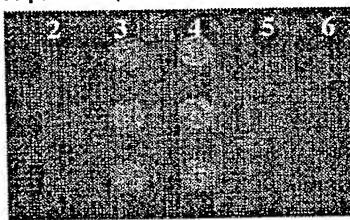
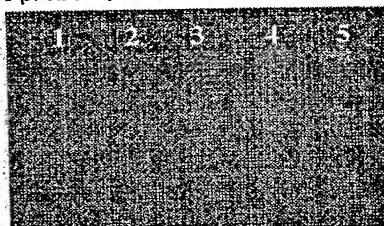
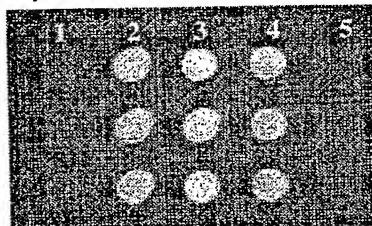
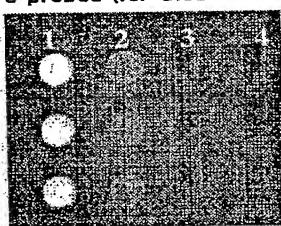
<220>
<223> Antisense primer 341R for PCR

<400> 118 20
caatgaccac aatttaaggg

【書類名】図面
【図1】

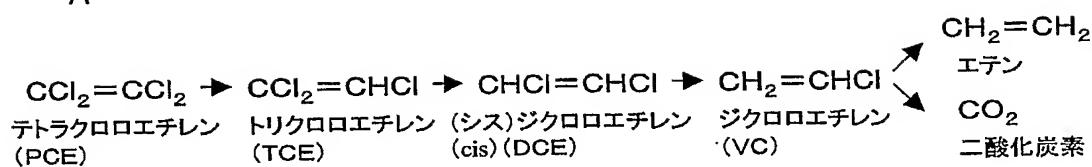


【図2】

A probes (for *Dehalospirillum multivorans*)M probes (for *Dehalobacter restrictus*)B probes (for *Desulfitobacterium frappieri*)N probes (for *Desulfitobacterium PCE1*)I probes (for *Desulfitobacterium hafniense*)O probes (for *Desulfitobacterium frappieri TCE1*)J probes (for *Clostridium formicoaceticum*)

【図3】

A



B

<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195 R	PCE → TCE → DCE → VC → ethene
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> B	PCE → TCE → cisDCE
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> I	
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> H	
<i>Desulfitobacterium</i> sp. strain PCE1 N	
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> TCE1 O	
<i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1 Q	
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> K	PCE → TCE → DCE
<i>Acetobacterium woodii</i> L	PCE → TCE
<i>Acetobacterium woodii</i> P	
<i>Clostridium formicoaceticum</i> J	PCE → TCE
<i>Dehalobacter restrictus</i> M	PCE → cisDCE
<i>Dehalospirillum multivorans</i> A	PCE → cisDCE
<i>Desulfomicrobium norvegicum</i> G	PCE → cisDCE
<i>Rhodococcus</i> sp. Sm-1 C	DEC, VC → CO ₂
<i>Rhodococcus rhodococcus</i> D	
<i>Xanthobacter flavus</i> E	DCE, VC → CO ₂
<i>Mycobacterium</i> L1 F	VC → CO ₂

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 P C E 分解関連バクテリアの検出に使用できる新規なポリヌクレオチドの提供を目的とする

【解決手段】

前記目的を達成するために、本発明のポリヌクレオチドは、17種の嫌気性P C E 分解関連バクテリアの16S-23S Internal Transcribed Spacer (I T S)領域に由来する、前記17種のバクテリアに特異的なポリヌクレオチドであって、配列番号1から17のいずれかの塩基配列に由来するポリヌクレオチド、または、配列番号19から105のいずれかの塩基配列に由来するポリヌクレオチドである。

【選択図】図1

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成16年 6月 3日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】 特願2004- 50082
【承継人】
【識別番号】 304019399
【住所又は居所】 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1
【氏名又は名称】 国立大学法人岐阜大学
【代表者】 学長 黒木登志夫
【連絡先】 部署名 学術情報部 産学連携課 担当者 知的財産係長 武田
正 電話番号 058-293-2088 (ダイヤルイン)
15文科会第1999号に基づく承継
【その他】

特願 2004-050082

出願人履歴情報

識別番号

[391012257]

1. 変更年月日

1991年 1月22日

[変更理由]

新規登録

住 所

岐阜県岐阜市柳戸1番1

氏 名

岐阜大学長

特願 2004-050082

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録
東京都千代田区霞が関 1-3-1
独立行政法人産業技術総合研究所

住所

氏名

特願 2004-050082

出願人履歴情報

識別番号

[591261336]

1. 変更年月日

2001年 3月26日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府吹田市垂水町3丁目28番33号

氏 名

松下環境空調エンジニアリング株式会社

特願 2004-050082

出願人履歴情報

識別番号

[304019399]

1. 変更年月日 2004年 4月 6日
[変更理由] 新規登録
住所 岐阜県岐阜市柳戸1番1
氏名 国立大学法人岐阜大学